

МЕТОДИКА КОНТРОЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОТЕРАПИИ БИОТКАНЕЙ

Разработана методика неинвазивного определения глубинных распределений спектров действия света на хромофоры биоткани *in vivo*. В качестве исходной информации используются сигналы обратного рассеяния ткани, измеряемые вне области посылки возбуждающего излучения. Решение обратной задачи выполняется с использованием аналитической модели спектра обратного рассеяния ткани и оперативного метода расчета плотности излучения в многослойной рассеивающей среде. Эффективность методики демонстрируется на примерах определения скорости фотоизомеризации билирубина при фототерапии желтухи у новорожденных, спектров действия света на фотосенсибилизатор и оксигемоглобин при фотодинамической терапии рака.

Ключевые слова: ткань; фототерапия; дозиметрия лазерного излучения; спектр действия света; билирубин; фотосенсибилизатор; оксигемоглобин.

A technique for non-invasive determination of the depth distributions of light action spectra recorded for chromophores of the biological tissues *in vivo* is developed. The backscattered light signals of a tissue at a distance from the area to which the exciting radiation is delivered are used as input data. The inverse problem is solved using an analytical model of the backscattering spectrum of a tissue and a rapid method to calculate the radiation density in the multilayered scattering medium. The efficiency of this technique is demonstrated by the examples obtained when determining the rate of bilirubin photoisomerization during neonatal jaundice phototherapy and by the light action spectra for the photosensitizer and oxyhemoglobin during photodynamic therapy of cancer.

Key words: tissue; phototherapy; laser radiation dosimetry; light action spectra; bilirubin; photosensitizer; oxyhemoglobin.

Эффективность различных механизмов воздействия света на биоткань пропорциональна световой мощности, поглощенной хромофором-мишенью в ткани (молекулярный кислород, фотосенсибилизатор, оксигемоглобин, билирубин и т. д.). Увеличение дозы облучения обеспечивает пропорциональный рост поглощенной световой мощности, но может вызывать ряд отрицательных эффектов передозировки лазерного излучения. Из-за экранирующего эффекта биоткани и вариаций ее оптических свойств мощность воздействующего излучения не связана напрямую с величиной световой мощности, поглощенной хромофором-мишенью. При этом далеко не все параметры, определяющие свойства биоткани и характер распространения в ней лазерного излучения, могут быть непосредственно измерены в эксперименте.

На практике выбор длины волны лазерного излучения и дозы облучения, как правило, осуществляется исходя из опыта врача и статистически накопленной информации. Достоверность такого подхода невысока и не позволяет стандартизировать методы лазерной терапии больных с одинаковой патологией, поскольку для обеспечения требуемого терапевтического эффекта выбор параметров лазерного излучения должен осуществляться с учетом оптических свойств облучаемой ткани пациента.

Количественной мерой эффективности фотопроцессов в облучаемой ткани, вызываемых поглощением света ее хромофором X , может служить спектр действия света на данный хромофор:

$$K_X(z, \lambda) = C_X(z)k_X(\lambda)E(z, \lambda), \quad (1)$$

где C_X и k_X – концентрация и коэффициент поглощения хромофора; $E(z, \lambda)$ – спектр плотности излучения на глубине ткани z , Вт/м².

В настоящее время в научной литературе отсутствуют публикации по определению спектров действия света на хромофоры ткани *in vivo*, поскольку для этого необходимо знать характеристики светового поля в глубине ткани. Между тем информация о функции $K_X(z, \lambda)$ играет первостепенную роль при решении задачи послойной дозиметрии лазерного излучения внутри тканей организма человека, поскольку позволяет при проведении сеансов лазерной терапии учитывать индивидуальные особенности ткани пациента, а также выбирать наиболее эффективные для него спектральные и энергетические параметры фотовоздействия. В связи с этим разработка методов определения функций $K_X(z, \lambda)$ для хромофоров биоткани является чрезвычайно актуальной задачей, имеющей большое практическое значение.

В настоящей статье описывается разработанная авторами методика неинвазивного определения плотности излучения в слоях ткани с различной глубиной залегания, а также спектров действия света на ее эндогенные и экзогенные хромофоры. Оценивается эффективность ее использования для решения задач дозиметрии лазерного излучения при фототерапии различных заболеваний.

Определение спектров действия света на хромофоры ткани *in vivo*

Идея, положенная авторами в основу неинвазивного определения функций $K_X(z, \lambda)$, состоит в следующем. Известно, что световое поле внутри среды и поле излучения, рассеянного ею в обратном направлении, определяются одними и теми же оптическими и структурными параметрами среды [1–3]. Характеристики обратного рассеяния (ОР) ткани могут быть непосредственно измерены в эксперименте, а ее оптические и структурные параметры – установлены путем решения соответствующей обратной задачи. Далее использованием методов теории переноса излучения можно рассчитать все

необходимые спектральные и пространственные характеристики светового поля внутри ткани, а также глубинные распределения спектров действия света на ее хромофоры. Таким образом, параметры фотоздействия, обеспечивающие оптимальный терапевтический эффект, можно выбирать по измеряемым в эксперименте характеристикам ОР ткани.

Наибольший практический интерес представляет возможность контроля эффективности поглощения света хромофорами ткани на основе относительно недорогих и коммерчески доступных устройств – волоконно-оптических спектрофотометров [4]. В устройствах такого типа в качестве источника излучения используется дейтериево-галогеновая лампа, а в качестве приемника – спектрометр на дифракционной решетке. Подвод излучения от источника к ткани и доставка обратно рассеянного тканью излучения к приемнику выполняются с помощью миниатюрного волоконно-оптического датчика, в котором волокна расположены в естественной конфигурации – шесть осветительных волокон вокруг одного считывающего.

Ранее авторами были разработаны простые и высокоточные методы расчета сигналов ОР кожи и слизистых оболочек, измеряемых на основе волоконно-оптических спектрофотометров [5, 6]. Для быстрого расчета распределения плотности излучения по глубине многослойной ткани можно с успехом использовать метод, предложенный авторами в работе [2]. Разработанные методы позволяют решать обратную задачу оптики светорассеивающих сред в реальном времени и с приемлемой для практики точностью. Проиллюстрируем вышесказанное на примерах контроля эффективности фотоизомеризации билирубина при фототерапии неонатальной желтухи, эффективности поглощения света фотосенсибилизатором и оксигемоглобином при фотодинамической терапии (ФДТ) рака.

Определение скорости фотоизомеризации билирубина

Наиболее распространенным методом лечения желтухи у новорожденных является фототерапия. При воздействии на кожу новорожденного оптическим излучением происходит трансформация находящихся в ней молекул токсичного ZZ-билирубина в его фотоизомер люмирубин (LR), который легко растворяется в воде и быстро выводится из организма.

При известной пространственной освещенности кожи $E(z, \lambda)$ скорость образования люмирубина M_{LR} можно рассчитать на основе следующего выражения [7]:

$$M_{LR}(\lambda) = \frac{C_{TB}\lambda}{L_d N_\mu h c} \frac{\int_{z_1}^{z_2} E(z, \lambda) \varepsilon_{ZZ}(\lambda) \phi_{LR}(\lambda) dz}{1 + \int_{z_1}^{z_2} E(z, \lambda) \varepsilon_{ZZ}(\lambda) \phi_{ZE}(\lambda) dz \bigg/ \int_{z_1}^{z_2} E(z, \lambda) \varepsilon_{ZE}(\lambda) \phi_{ZZ}(\lambda) dz}, \quad (2)$$

где λ – длина волны воздействующего излучения; C_{TB} – концентрация общего билирубина в ткани (с учетом всех его изомеров); $h = 6,63 \cdot 10^{-34}$ Дж · с – постоянная Планка; $c = 3 \cdot 10^{10}$ см/с – скорость света; $N_\mu = 6,02 \cdot 10^{23}$ моль⁻¹ – число Авогадро; ε_{ZZ} , ε_{ZE} – молярные коэффициенты поглощения ZZ- и ZE-билирубина; ϕ_{ZZ} , ϕ_{ZE} и ϕ_{LR} – квантовые выходы фототрансформаций $ZE \rightarrow ZZ$, $ZZ \rightarrow ZE$ и $ZZ \rightarrow LR$ соответственно; L_e и L_d – геометрические толщины эпидермиса и дермы; $z_1 = L_e$, $z_2 = L_e + L_d$.

Эффективность использования предлагаемого метода для определения $M_{LR}(\lambda)$ оценим на основе результатов численного моделирования переноса излучения в коже. Будем рассматривать модель кожи, описанную в работе [8]. Сигналы ОР кожи $r(\lambda)$ рассчитывались методом Монте-Карло (МК) [9] как отношение суммарного «веса» фотонов, вылетевших из круговой приемной площадки на поверхности среды, к общему «весу» всех фотонов, введенных в среду в пределах осветительной площадки. Диаметр осветительной и приемной площадок задавался равным 0,8 мм, расстояние между их центрами – 0,83 мм. Плотность излучения на глубине среды z рассчитывалась путем суммирования «веса» всех фотонов, пролетевших через уровень z во всех направлениях.

Модельные параметры восстанавливались из нормированных спектров ОР кожи $\omega(\lambda) = r(\lambda)/r(\lambda_{ref})$ (где $\lambda = 450\text{--}750$ нм; $\lambda_{ref} = 750$ нм) методом, подробно изложенным в работе [6]. Исходные спектры $\omega(\lambda)$ (рис. 1, а) соответствовали одинаковому содержанию изомеров билирубина в коже и различному содержанию других ее хромофоров (гемоглобина, меланина, коллагена). Освещенность кожи полагалась независимой от λ и равной 1 мВт/см². Зависимости $M_{LR}(\lambda)$, соответствующие смоделированным спектрам $\omega(\lambda)$ и восстановленные из них, представлены на рис. 1, б. Видно, что предлагаемый метод позволяет получать достаточно точные оценки $M_{LR}(\lambda)$ в спектральной области поглощения света изомерами билирубина (450–530 нм). Знание $M_{LR}(\lambda)$, в свою очередь, позволяет выбрать спектральные и энергетические параметры фотоздействия, обеспечивающие наибольший терапевтический эффект при минимальной дозе облучения.

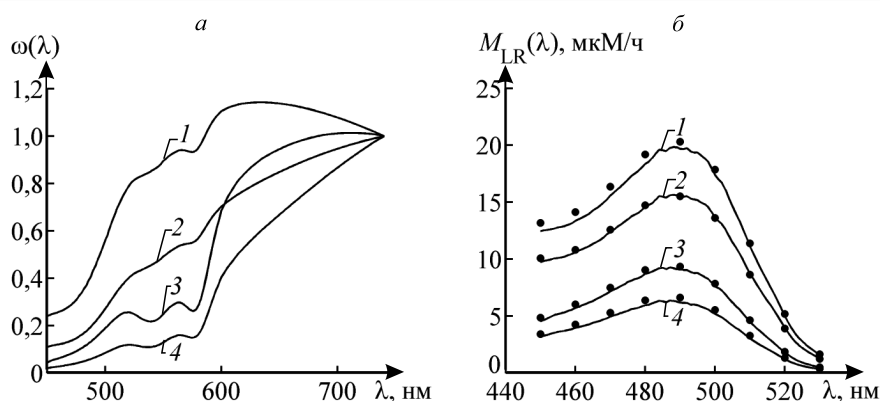


Рис. 1. Восстановление спектральной зависимости скорости фотоизомеризации билирубина по спектру ОР кожи. Кривые 1–4 соответствуют результатам численных расчетов $\omega(\lambda)$ (а) и $M_{LR}(\lambda)$ (б) методом Монте-Карло при различных параметрах кожи, точки – результатам восстановления $M_{LR}(\lambda)$

Контроль эффективности фотодинамической терапии

Для эффективного проведения ФДТ рака и минимизации побочных неблагоприятных эффектов необходимо контролировать спектры действия света на фотосенсибилизатор $K_{ps}(z, \lambda)$ в слоях ткани с различной глубиной залегания. Такой контроль также может выполняться на основе вышеописанной малогабаритной системы измерения ОР ткани.

Рассмотрим в качестве примера фотосенсибилизатор Фотосенс. Полагаем, что он локализован в тканях дермы, где располагаются кровеносные сосуды. Точность определения $K_{ps}(z, \lambda)$ оценим предлагаемым методом на основе результатов численного расчета $K_{ps}(z, \lambda)$ и $\omega(\lambda)$ методом МК [2, 3, 9]. Спектр $\omega(\lambda)$, отвечающий вышеописанной геометрии волоконно-оптических измерений, представлен

на рис. 2, а. Функции $K_{ps}(\lambda) = \int_{z_1}^{z_2} K_{ps}(z, \lambda) dz$, рассчитанные методом МК для трех слоев среды (z_1 – z_2) и реконструированные по спектру $\omega(\lambda)$, сопоставлены на рис. 2, б. Видно, что несущественные различия между истинными и восстановленными профилями $K_{ps}(\lambda)$ имеют место лишь для глубоких слоев среды, в которые видимый свет практически не проникает. Для получения информации о данных слоях следует дополнить рассматриваемые измерения $\omega(\lambda)$ ближним ИК-диапазоном, излучение которого способно достаточно глубоко проникать в биоткани.

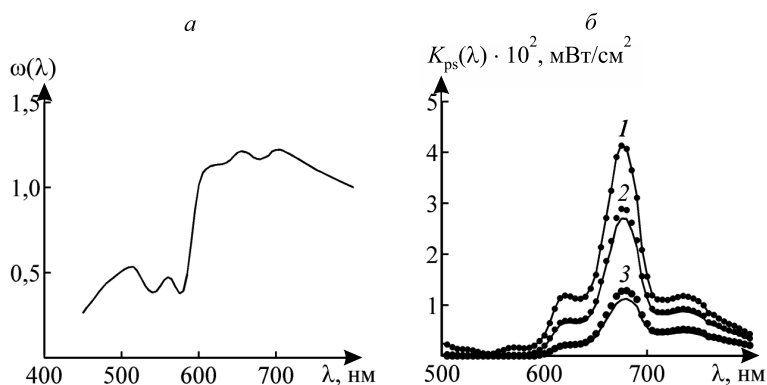


Рис. 2. Восстановление по спектру ОР кожи (а) спектра действия света на фотосенсибилизатор Фотосенс (б). Точки и кривые – истинные и восстановленные спектры $K_{ps}(\lambda)$ соответственно; 1 – $z_1 = 0,1$ мм, $z_2 = 1$ мм; 2 – $z_1 = 1$ мм, $z_2 = 2$ мм; 3 – $z_1 = 3$ мм, $z_2 = 5,0$ мм

Экспериментальные оценки эффективности поглощения света оксигемоглобином в кровеносных сосудах кожи

Эффективным методом устранения недостатка кислорода (гипоксии) в зоне опухоли при фотодинамической терапии является его дополнительная экстракция за счет лазерно-индуцированной фотодиссоциации оксигемоглобина (HbO_2) [10]. В связи с этим представляет интерес исследование влияния на эффективность данного процесса структурно-морфологических особенностей кожи пациента. Для этой цели использовалось 30 добровольцев (25 мужчин и 5 женщин в возрасте от 20 до 65 лет). Измерения спектра ОР кожи добровольцев выполнялись на основе волоконно-оптического спектрофотометра Avantes [4]. Для исключения контакта датчика с кожей, влияющего на точность определения ее

параметров, посылка излучения на кожу и сбор обратно рассеянного ее светового потока выполнялись через объектив, по отношению к которому торец волоконно-оптического зонда и исследуемый участок кожи находились в оптически сопряженных плоскостях. При этом достигалось двукратное увеличение площадок облучения и регистрации рассеянного света (диаметр $\approx 0,8$ мм) по сравнению с контактными измерениями. Параметры кожи, найденные по спектру ее ОР [6], использовались для расчета глубинного распределения в ней плотности излучения $E(z, \lambda)$. Спектр эффективности фотодиссоциации HbO_2 рассчитывался по формуле

$$n(z, \lambda) = f_{\text{bl}} S C_{\text{Hb}} \ln 10 \varepsilon_{\text{HbO}_2}(\lambda) E(z, \lambda) (q\lambda / hc), \quad (3)$$

где f_{bl} – объемное содержание кровеносных сосудов в тканях дермы; S – степень оксигенации крови; C_{Hb} – молярная концентрация гемоглобина в крови ($\approx 2,3$ mM), $\varepsilon_{\text{HbO}_2}$ – молярный коэффициент поглощения света оксигемоглобином; h – постоянная Планка; c – скорость света в среде; q – квантовый выход фотодиссоциации HbO_2 [11].

Анализ интегральных по всей толще дермы спектров эффективности фотодиссоциации HbO_2 $n(\lambda)$, восстановленных из экспериментальных спектров ОР кожи, показывает, что количество молекулярного кислорода, высвобождаемое из кровеносных сосудов дермы в окружающую ткань при единичной освещенности кожи, существенно зависит от параметров кожи и для различных анатомических участков тела одного и того же человека может различаться более чем в 10 раз. Очевидно, что данное обстоятельство необходимо учитывать при проведении сеансов лазерной терапии, для того чтобы повысить эффективность генерации молекулярного кислорода в ткани и избежать нежелательных последствий лечения. Возможность такого учета открывает разработанный авторами физико-математический инструментарий [2, 5, 6]. В качестве примера (рис. 3) представлены спектры ОР кожи, измеренные в четырех точках на теле одного из добровольцев, и спектры $n(\lambda)$, рассчитанные по этим данным.

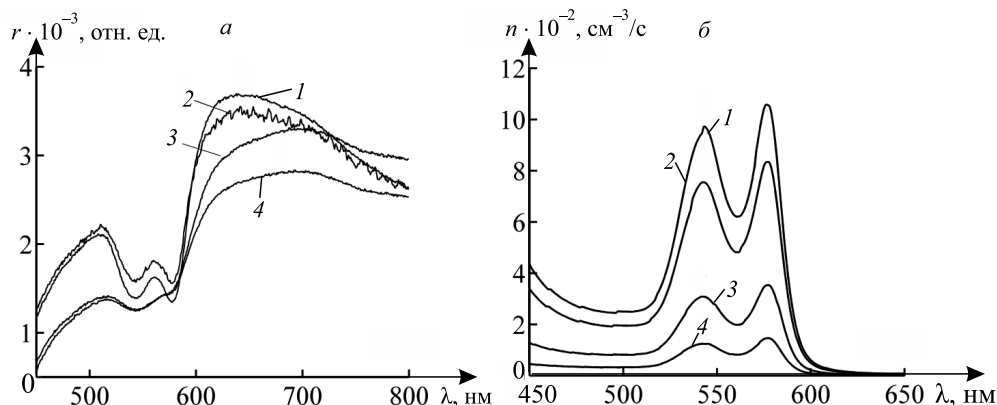


Рис. 3. Результаты восстановления из экспериментальных спектров ОР кожи (а) спектральной зависимости эффективности фотодиссоциации HbO_2 (б), соответствующих большому пальцу (1, 2) и тыльной стороне ладони (3, 4) правой (1, 3) и левой (2, 4) руки добровольца

Корректность оценок параметров кожи и рассчитанных по ним спектров $n(\lambda)$ косвенно подтверждается близостью значений параметров кровеносного русла кожи, восстановленных из спектров ее ОР в симметрично расположенных точках тела человека. Так, несмотря на заметные различия представленных спектров ОР кожи на правой и левой руке добровольца, восстановленные из них параметры f_{bl} и S , входящие в формулу (3), имеют достаточно близкие значения (см. рис. 3): 1 – $f_{\text{bl}} = 1,6$ %, $S = 81$ %; 2 – $f_{\text{bl}} = 1,4$ %, $S = 80$ %; 3 – $f_{\text{bl}} = 0,71$ %, $S = 33$ %; 4 – $f_{\text{bl}} = 0,67$ %, $S = 30$ %.

Таким образом, разработанная методика неинвазивного определения спектров действия света на эндогенные и экзогенные хромофоры ткани позволяет оперативно и с приемлемой для практики точностью решать задачи послойной дозиметрии лазерного излучения и выбирать оптимальные спектральные и энергетические параметры фотовоздействия на ткань. Данная методика может использоваться в клинической и исследовательской практике для разработки новых эффективных подходов к фототерапии различных заболеваний, учитывающих индивидуальные особенности ткани пациента, а также для стандартизации методов лечения больных с одинаковой патологией.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Барун В. В., Иванов А. П., Волотовская А. В., Улащик В. С. Спектры поглощения и глубина проникновения света в нормальную и патологически измененную кожу человека // Журн. прикл. спектроскопии. 2007. Т. 74, № 3. С. 387–394.
2. Лысенко С. А., Кугейко М. М. Метод расчета характеристик световых полей в задачах оптической диагностики и персонализированной терапии биологических тканей // Журн. прикл. спектроскопии. 2013. Т. 80, № 2. С. 273–280.

3. Лысенко С. А., Кугейко М. М., Лисенкова А. М. Неинвазивное определение спектральной глубины проникновения света в кожу // Оптика и спектроскопия. 2013. Т. 115, № 5. С. 184–191.

4. Автоматизированный оптоволоконный спектрофотометр AvaSpec-256 [Электронный ресурс] // Avantes: решения в спектроскопии. Режим доступа: <http://www.avantes.net/spectroavaspec256.php.html> (дата обращения: 14.07.2014).

5. Лысенко С. А., Кугейко М. М., Фираго В. А., Собчук А. Н. Неинвазивный экспресс-анализ содержания гемоглобинов в крови с использованием оптоволоконного спектрофотометра // Журн. прикл. спектроскопии. 2014. Т. 81, № 1. С. 128–136.

6. Лысенко С. А., Кугейко М. М., Фираго В. А., Собчук А. Н. Аналитическая модель спектра диффузного отражения кожной ткани // Квантовая электроника. 2014. Т. 44, № 1. С. 69–75.

7. Agati G., Fusi F. Quantum yield and skin filtering effects on the formation rate of lumirubin // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1993. Vol. 18, № 2/3. P. 197–203.

8. Лысенко С. А., Кугейко М. М. Метод оперативной количественной интерпретации мультиспектральных изображений биологических тканей // Оптика и спектроскопия. 2013. Т. 115, № 4. С. 148–157.

9. Лысенко С. А., Кугейко М. М. Метод оперативной количественной интерпретации спектрально-пространственных профилей диффузного отражения биологических тканей // Оптика и спектроскопия. 2013. Т. 114, № 2. С. 105–114.

10. Асимов Р. М., Асимов М. М., Рубинов А. Н. Лазерно-индуцированная оксигенация биотканей: новая технология устранения тканевой гипоксии в раковых опухолях // Лазерная медицина. 2008. Т. 12, № 1. С. 9–14.

11. Лепешкевич С. В., Коновалова Н. В., Джагаров Б. М. Исследование методом лазерной кинетической спектроскопии бимолекулярных стадий реакции оксигенации α - и β -субъединиц гемоглобина человека в R-состоянии // Биохимия. 2003. Т. 68, № 5. С. 676–685.

Поступила в редакцию 27.08.2014.

Сергей Александрович Лысенко – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры информатики и компьютерных систем.

Михаил Михайлович Кугейко – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой квантовой радиофизики и оптоэлектроники.

Алла Мустафовна Лисенкова – научный сотрудник кафедры квантовой радиофизики и оптоэлектроники.

Владимир Александрович Фираго – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры квантовой радиофизики и оптоэлектроники.

Татьяна Александровна Железнякова – старший преподаватель кафедры физики и аэрокосмических технологий.